

NOVEL CHITOSAN PARTICLE

Patent number: JP63097633
Publication date: 1988-04-28
Inventor: ITO YOSHIO; ITOYAMA MITSUNORI; YABE HIROAKI
Applicant: FUJI SPINNING CO LTD
Classification:
- **international:** C08B37/08; C08J3/12; C08J3/24; C12N5/02;
C12N11/10; C12P21/00
- **europen:**
Application number: JP19860242545 19861013
Priority number(s): JP19860242545 19861013

[Report a data error here](#)

Abstract of JP63097633

PURPOSE: To obtain the title particles excellent in safety, biocompatibility and swellability and useful as a carrier for physiologically active substances, by reacting specified chitosan particles with an aromatic compound and crosslinking the product with an organic diisocyanate.

CONSTITUTION: Chitosan particles (A) are obtained by coagulating a 3-6% acidic aqueous chitosan solution obtained by dissolving chitosan of an average MW of 10,000-230,000 in an aqueous acid solution (e.g., aqueous acetic acid solution) by feeding it under a pressure to a basic aqueous solution (e.g., aqueous NaOH solution) optionally containing a polar alcohol. Component A is reacted with 0.1-0.5mol, per mol of the glucosamine residues of component A, of an aromatic compound (B) (e.g., cyanuric chloride) in a polar solvent (e.g., dimethylformamide), and the product is crosslinked in a polar solvent containing 5-10% organic diisocyanate compound (C) (e.g., hexamethylene diisocyanate) to obtain the title particles having an apparent density of 0.015-0.030g/ml and a particle diameter of 0.10-0.35mm.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

⑯ 公開特許公報 (A) 昭63-97633

⑯ Int.Cl.⁴
 C 08 J 3/24
 C 08 B 37/08
 C 08 J 3/12
 C 12 N 5/02
 C 12 P 11/10
 C 12 P 21/00

識別記号 CEP
 CEP
 CEP

厅内整理番号 8115-4F
 6779-4C
 Z-8115-4F
 6760-4B
 7329-4B
 6712-4B

⑯ 公開 昭和63年(1988)4月28日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全4頁)

⑯ 発明の名称 新規なキトサン粒状物

⑯ 特願 昭61-242545
 ⑯ 出願 昭61(1986)10月13日

⑯ 発明者 伊藤由雄 静岡県駿東郡小山町藤曲142-3
 ⑯ 発明者 糸山光紀 静岡県駿東郡小山町藤曲142-3
 ⑯ 発明者 谷邊博昭 静岡県駿東郡小山町小山129-1
 ⑯ 出願人 富士紡績株式会社 東京都中央区日本橋人形町1丁目18番12号
 ⑯ 代理人 弁理士 大野克躬 外2名

明細書

1. 発明の名称

新規なキトサン粒状物

2. 特許請求の範囲

- キトサン酸性水溶液を堿基性溶液中で成形して得られたキトサン粒状体を、芳香族化合物と反応せしめた後、有機ジイソシアネート化合物で架橋させてなる新規なキトサン粒状物。
- 見掛密度が 0.015～0.030 g/cm³ である特許請求の範囲第1項に記載の新規なキトサン粒状物。
- 粒径が 0.10～0.35 mm である特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の新規なキトサン粒状物。
- キトサン酸性水溶液を堿基性溶液中で成形して得られたキトサン粒状体を、芳香族化合物と反応せしめた後、有機ジイソシアネート化合物で架橋させてなる、見掛密度が 0.015～0.30 g/cm³、粒径が 0.10～0.35 mm であるキトサン粒状物よりなる生理活性物質用担体。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は安全性、生体適合性、膨潤性に優れた新規なキトサン粒状物に関するもので、本発明によるキトサン粒状体は、生理活性物質の分離、精製及び固定化、細胞培養用等に利用出来る。

【従来の技術】

従来、キトサン成形物の細胞培養用基質への利用はなされたことがなかった。本発明者等は、先に特願昭60-191624号としてキトサンを酸性水溶液に溶解し、これを堿基性溶液で成形させたキトサン粒状物である細胞培養用基質或いはそれに架橋処理をした細胞培養用基質を発明し、出願した。この発明によって得られたキトサン粒状体は、形状、安全性、生体適合性、機械的強度に関して全く問題はなかった。しかしながらこのようにして得られたキトサン粒状体は膨潤性が乏しいために液体中での懸濁性に問題があり均一な懸濁状態が得られなかった。

【発明が解決しようとする問題点】

本発明は、上述したキトサン粒状物の膨潤性を向上させ均一な懸濁液を得るための懸濁性を解決するものである。

即ち、本発明は従来のキトサン粒状物の有する安全性、生体適合性を損うことなく膨潤性を附与させた粒径 0.10 ~ 0.35 mm、見掛密度 0.015 ~ 0.030 g / 咸である新規なキトサン粒状物を得ることを目的とする。

【問題点を解決するための手段】

本発明の新規なキトサン粒状物は、キトサンを原料として、これを酸性水溶液中に溶解し、これを塩基性溶液中で粒状体に成形し、該成形物を芳香族化合物で反応させ更に有機ジイソシアネート化合物で架橋する製造方法により得られる。

使用するキトサンは特に限定はされないが、平均分子量が 10,000 ~ 230,000 の低分子量キトサンを用いることが好ましい。キトサンは、酢酸、ジクロル酢酸、蟻酸等の単独、若しくは混合物の水溶液に溶解する。キトサン酸性水溶液の濃度は 3 ~ 6 % が好ましく、該キトサン酸性水溶液は水酸

化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、アンモニア、エチレンジアミン等のアルカリ性物質を含む塩基性水溶液中で凝固せしめる。塩基性水溶液にはメタノール、エタノール等の極性を有するアルコール類を加えて使用することも出来る。

キトサン酸性水溶液を吐出口より圧力下に塩基性水溶液よりなる凝固浴中に連続的又は一定量ずつ供給、凝固させ粒状物を得、これを中性になるまで充分に水洗を行う。

上記のようにして得られたキトサン粒状物は、塩化シアヌル、無水フタル酸、無水安息香酸、サリチル酸、ベンジルクロライド、ベンズアルデヒド等の芳香族化合物をキトサンのグルコサミン残基 1 モルに対し 0.1 ~ 0.5 モルの割合で溶解した極性溶媒中で反応処理を行い、更に有機ジイソシアネート化合物を 5 ~ 10 % 含む極性溶媒中で架橋反応を行う。これを更に極性溶媒で洗浄後、充分に水洗して新規な膨潤性に優れたキトサン粒状物が得られる。

上記のようにして得られたキトサン粒状物は、芳香族置換基を有する架橋キトサンよりなるが、使用する芳香族化合物がキトサンのグルコサミン残基 1 モルに対し、0.1 モル以下の場合には有機ジイソシアネート化合物による架橋が強固なものとなり膨潤性が低下して好ましくなく、又、0.5 モル以上の芳香族化合物を使用すると、得られるキトサン粒状物の見掛密度が 0.08 g / 咸以上となって堅い粒状物となり、懸濁性が阻害されるので好ましくない。

上記反応に使用する極性溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等のアミド類が使用出来る。又、架橋反応に使用する有機ジイソシアネート化合物としては、4,4' - ジフェニルメタンジイソシアネート、1,4 - フェニレンジイソシアネート、2,4 - トリレンジイソシアネート、ナフタレンジイソシアネート、1,4 - シクロヘキサンジイソシアネー

ト、4,4 - ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート、キシリレンジイソシアネート、イソフォロジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネート等が使用出来る。

本発明によって得られる新規なキトサン粒状物は、粒径 0.10 ~ 0.35 mm、見掛密度 0.015 ~ 0.030 g / 咸であることが望ましい。見掛密度は上記のように反応させる芳香族化合物及び有機ジイソシアネート化合物の量を適宜選定することによって調節することができる。粒径についてはキトサン成形時に用いるキトサン酸性水溶液の濃度、キトサン酸性水溶液の吐出液量、ノズル孔径等によって調節可能である。本発明のキトサン粒状物を細胞培養用基質等生理活性物質用担体として使用するためには、キトサン粒状体の表面積を大きくすること及び懸濁液として用いる場合の攪拌抵抗を小さくする等の理由から 0.10 ~ 0.35 mm であることが望ましく、また、見掛密度については、次のような理由から上記範囲が定められる。

先に、本発明者等が特願昭 60 - 191624 号で出願

した細胞培養用のキトサン粒状物は、粒径の調節は可能であるが見掛密度が 0.08 ~ 0.10 g/cm³ であり、これを使用して液体中で均一な懸濁液を得ることは、かなり困難であり、例えば細胞培養用の攪拌機（バイオファーメンター BF-R403A, シバタハリオ製）では 90 rpm 以上の回転力が必要となり、実用に供するのに問題がある。通常のマイクロキャリヤー培養の場合には 50 ~ 60 rpm、改良タイプの攪拌機では 20 ~ 40 rpm の攪拌速度であることが好ましく、本発明によりキトサン粒状物に膨潤性をもたせ、上記の見掛密度とすれば通常の攪拌において充分な懸濁液が得られる。

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を説明する。尚、本発明において粒径の測定は、マイクロメーターを挿入した双眼実体顕微鏡で測定し、見掛密度は 100 ml の試料の絶乾重量 (g) より求めた。

実施例 1

平均分子量 48,000 で脱アセチル化度 82% のキトサン 10 g を酢酸 5 g を含む酸性水溶液 200 ml に溶

解し、0.15 mm のノズルから N₂ 広 2.0 kg/cm² で 10% NaOH, 30% CH₃ OH と水からなる堿基性溶液中に落下させて凝固成形した。これを中性になる迄充分水洗し粒径 0.074 ~ 0.105 mm (湿潤状態) のキトサン粒状物 100 ml を得た。これを 100 ml のジメチルホルムアミドで 3 回置換後、堿化シアヌル 4 g を含むジメチルホルムアミド 100 ml を加えて室温で 1 時間反応させた。更にジメチルホルムアミドで洗浄した後、ヘキサメチレンジイソシアネート 5 g を含むジメチルホルムアミド 100 ml を加え、室温で 1 時間反応架橋させた。これをジメチルホルムアミドで洗浄した後充分に水洗してキトサン粒状物を得た。

このキトサン粒状物の粒径は 0.21 ~ 0.29 mm (湿潤状態) で、見掛密度は 0.025 ~ 0.030 g/cm³ であり、攪拌装置（バイオファーメンター BF-R403A, シバタハリオ製）を用い 30 ~ 50 rpm で攪拌したところ充分均一な懸濁状態が得られた。

上記のようにして得られたキトサン粒状物（試料 I）と、比較のために上記のキトサン酸性水溶

液から凝固再生したキトサン粒状物を堿化シアヌルで処理することなく、ヘキサメチレンジイソシアネート 10 g を含むジメチルホルムアミド 100 ml を加え、室温で 1 時間の架橋処理をして得た粒径 0.1 ~ 0.2 mm, 見掛密度 0.08 ~ 0.09 g/cm³ のキトサン粒状体（試料 II）についてそれぞれ細胞培養における効果を調べた。

即ち、試料 I 及び II の夫々 0.1 ml に対してマウス結合組織由来の線維芽細胞 L-929 を 10% の血清を含むイーグルの最少必須培地に 5.0 × 10⁴ cells/ml になるように調整した細胞懸濁液 5 ml を加え、37°C, CO₂ 5% 霧面気下で 1, 2, 4 日間培養し、浮遊細胞と培養液を磷酸緩衝液で除去し、生着細胞をトリプシン-EDTA 溶液処理で剥離し、しきる後溶液を 700 rpm, 6 分間遠心分離し、トリプシン-EDTA 溶液等を除去後、沈殿した細胞を磷酸緩衝液 2 ml 中に懸濁し、血球計算盤により計測し細胞数について第 1 表の如き結果を得た。

この結果から本発明の製造方法で得たキトサン粒状物は細胞培養用に供するに充分なる効果のあ

ることが判る。

第 1 表

	細胞数 (× 10 ⁵ cells / ml 粒状物)		
	1 日後	2 日後	4 日後
試料 I	1.45 ± 0.42	1.80 ± 0.31	3.43 ± 0.56
試料 II	1.49 ± 0.11	1.62 ± 0.47	2.85 ± 0.63

実施例 2

平均分子量 60,000 で脱アセチル化度 80% のキトサン 6 g を酢酸 5 g を含む酸性水溶液 200 ml に溶解し、0.15 mm のノズルから N₂ 広 2.0 kg/cm² で、10% NaOH, 30% CH₃ OH と水からなる堿基性溶液中に落下させて凝固成形した。これを中性になる迄十分水洗し粒径 0.074 ~ 0.105 mm (湿潤状態) のキトサン粒状物 100 ml を得た。これを 100 ml のジメチルホルムアミドで 3 回置換後、無水安息香酸 1 g を含むジメチルホルムアミド 100 ml を加えて室温で 1 時間反応させた。更にジメチルホルム

アミドで洗浄した後、4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート5gを含むジメチルホルムアミド100mlを加え室温で1時間反応架橋させた。これをジメチルホルムアミドで洗浄した後充分に水洗してキトサン粒状物を得た。

このキトサン粒状物の粒径は0.31～0.35mm（湿润状態）で見掛密度は0.015～0.022g/mlで、攪拌装置（バイオファーメンターBF-R403A、シバタハリオ製）を用い20～30rpmで攪拌したところ充分均一な懸濁状態が得られた。

実施例3

平均分子量38,000で脱アセチル化度78%のキトサン12gを酢酸5gを含む酸性水溶液200mlに溶解し、0.15mmのノズルからN₂圧2.0kg/cm²で10%NaOH、30%CH₃OHと水からなる塩基性溶液中に落下させて凝固成形した。これを中性になる迄充分水洗し粒径0.074～0.105mm（湿润状態）のキトサン粒状物100mlを得た。これを100mlのジメチルホルムアミドで3回置換後、無水フタル酸1.2gを含むジメチルホルムアミド100mlを加

えて室温で1時間反応させた。更にジメチルホルムアミドで洗浄した後、ヘキサメチレンジイソシアネート10gを含むジメチルホルムアミド100mlを加え室温で1時間反応架橋させた。これをジメチルホルムアミドで洗浄した後、充分に水洗してキトサン粒状物を得た。

このキトサン粒状物の粒径は0.27～0.31mm（湿润状態）で、見掛密度は0.023～0.029g/mlで、攪拌装置（バイオファーメンターBF-R403A、シバタハリオ製）を用い20～40rpmで攪拌したところ充分均一な懸濁状態が得られた。

【発明の効果】

本発明の製造方法によって得られたキトサン粒状物は、上記実施例の記載から明らかなように膨潤性が高いので、液体中でも温和な攪拌条件で均一な懸濁状態を得ることが出来、取扱いが更に便利なものにすることが出来る。更にキトサン本来の具備している安全性、生体適合性を損うことがないので極めて有用なキトサン粒状体が提供されるものである。

